

7/19/1 DIALOG(R)File 351:Derwent WPI (c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007303362

WPI Acc No: 1987-300369/198743

Related WPI Acc No: 1992-098417

XRAM Acc No: C87-127778

XRPX Acc No: N87-224397

Signal processing for determining base sequence of nucleic acid - by comparing detected bands among the resolved rows on the basis of the band positions

Patent Assignee: FUJI PHOTO FILM CO LTD (FUJF)

Inventor: HARA M

Number of Countries: 006 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 242629	A	19871028	EP 87104502	A	19870326	198743 B
JP 62225956	A	19871003	JP 8669074	A	19860326	198745
JP 63191959	A	19880809	JP 8725010	A	19870204	198837
US 4885696	A	19891205	US 8730062	A	19870325	199006
EP 242629	B1	19920826	EP 87104502	A	19870326	199235
DE 3781307	G	19921001	DE 3781307	A	19870326	199241
			EP 87104502	A	19870326	
JP 93029070	B	19930428	JP 8669074	A	19860326	199320
JP 94064058	B2	19940822	JP 8725010	A	19870204	199432

Priority Applications (No Type Date): JP 8725010 A 19870204; JP 8669074 A 19860326

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; A3...8930; EP 132621; JP 58076754; No-SR.Pub; EP 113672

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 242629	A	E	14		
-----------	---	---	----	--	--

Designated States (Regional): DE FR NL

US 4885696	A		13		
------------	---	--	----	--	--

EP 242629	B1	E	12	G01T-001/29	
-----------	----	---	----	-------------	--

Designated States (Regional): DE FR NL

DE 3781307	G			G01T-001/29	Based on patent EP 242629
------------	---	--	--	-------------	---------------------------

JP 93029070	B		9	G01N-033/60	Based on patent JP 62225956
-------------	---	--	---	-------------	-----------------------------

JP 94064058	B2		7	G01N-033/50	Based on patent JP 63191959
-------------	----	--	---	-------------	-----------------------------

Abstract (Basic): EP 242629 A

A signal processing method by subjecting digital signals to signal processing, the digital signals corresponding to an autoradiograph of resolved rows which are formed by resolving a mixt. of base-specific DNA fragments or RNA fragments labelled with a radioactive element in a one-dimensional direction on a support comprises (A) (1) prepg. a 1-dimensional waveform composed of position along the resolving direction and signal level for each resolved row, (2) calculating a mean value of the signal levels in domains having a given level or above within a given interval from a search-fiducial point on the 1-dimensional waveform, (3) determining a threshold value based on the mean level value, (4) searching the interval for peaks where the signal level is not less than the threshold value, (5a) determining in that a band exists and allowing the peak position to be the next search-fiducial point, when a peak is found in step (4) or (5b)

This Page Blank (note)

allowing a position forward by a given distance from the search-fiducial point to be the next search-fiducial point, when no peak is found in step (4) and (6) repeating in order the steps (2)-(5) to detect all bands on the resolved rows, or (B) (1) prepg. at least 2 1-dimensional waveforms and following a specified method.

ADVANTAGE - In (A), only intrinsic bands can be completely detected on the basis of a threshold value fluctuating from interval to interval. In (B), only intrinsic bands can be detected by excluding noise in such a manner that there are prepd. many rasters for each resolved row.

Abstract (Equivalent): EP 242629 B

A signal processing method for determining base sequence of nucleic acids by subjecting digital signals to signal processing, said digital signals corresponding to an autoradiograph of plural resolved rows which are formed by resolving a mixture of base-specific DNA fragments or base-specific RNA fragments labeled with a radioactive element in a resolving direction of a support medium, which comprises steps of: (1) preparing a waveform representing signal level against position along the resolving direction, for each resolved row; (2) calculating a means value of the signal levels in domains having a given level or above within a given interval from a search-fiducial point on a waveform; (3) determining a threshold value based on the mean level value; (4) searching said interval for a peak where the signal level is not less than the threshold value; (5a) determining that a band exists at the peak position and allowing the peak position to be the next search-fiducial point, when a peak is found in the step (4); or (5b) allowing a position forward by a given distance from said search-fiducial point to be the next search-fiducial point, when no peak is found in the step (4); and (6) repeating in order the steps (2) to (5) to thereby detect all bands on the resolved rows. (Dwg.1/4)

Abstract (Equivalent): US 4885696 A

The base sequence of a nucleic acid is determined by obtaining digital signals corresp. to an auto-radiograph of a resolved pattern including resolved rows consisting of 4 rows formed by resolving each of 4 gps. of a mixt. of base-specific nucleic acid fragments on a support medium labelled with a radioactive element that have migrated in a one-dimensional migration direction on the support medium and processing the digital signals obt'd. to determine the nucleic acid base sequence.

Processing method includes (a) generating a wave-form including peaks representative of base position in the resolving direction and the signal level for each resolved row; (b) selecting a search-fiducial point, an internal adjacent the point and a signal level on the wave-form; (c) defining domains within the internal; (d) determining a mean signal level value of the wave-form signal levels and selecting a threshold signal value; (e) searching the interval to located a peak having a signal level above the threshold signal value; and (f) determining the nucleic acid base sequence.

ADVANTAGE - Sequence is automatically determined with ease and high accuracy.

Title Terms: SIGNAL; PROCESS; DETERMINE; BASE; SEQUENCE; NUCLEIC; ACID; COMPARE; DETECT; BAND; RESOLUTION; ROW; BASIS; BAND; POSITION

Derwent Class: B04; D16; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/50; G01N-033/60; G01T-001/29

International Patent Class (Additional): C07H-021/00; G01N-027/26;

G01N-027/447; G01N-030/02; G01N-031/00; G06F-015/46

This Page Blank

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04A1; B05-A04; B11-C07B5; B12-K04A; D05-H09;
D05-H12; J04-B01A

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E09C

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M750 M903 N102 Q233 Q435 V753

02 B615 C053 C101 C106 C116 C811 M423 M781 M903 N102 P831 Q233 Q435
Q505 V753

Chemical Fragment Codes (M6):

03 M903 P831 Q233 Q435 Q505 R513 R521 R528 R536 R626 R639

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2004 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2004 Dialog, a Thomson business

This Page Blank



P 40905 DE

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Übersetzung der europäischen Patentschrift

⑤1 Int. Cl.⁵:
G 01 T 1/29
G 01 N 33/00

⑧7 EP 0 242 629 B1

⑩ DE 37 81 307 T 2

- | | |
|--|--------------|
| ②1 Deutsches Aktenzeichen: | 37 81 307.2 |
| ⑧6 Europäisches Aktenzeichen: | 87 104 502.7 |
| ⑧6 Europäischer Anmeldetag: | 26. 3. 87 |
| ⑧7 Erstveröffentlichung durch das EPA: | 28. 10. 87 |
| ⑧7 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: | 26. 8. 92 |
| ④7 Veröffentlichungstag im Patentblatt: | 21. 1. 93 |

DE 37 81 307 T 2

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1

26.03.86 JP 69074/86 04.02.87 JP 25010/86

⑦3 Patentinhaber:

Fuji Photo Film Co., Ltd., Minami-ashigara,
Kanagawa, JP

⑦4 Vertreter:

Grünecker, A., Dipl.-Ing.; Kinkeldey, H., Dipl.-Ing.
Dr.-Ing.; Stockmair, W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing. Ae.E. Cal
Tech; Schumann, K., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Jakob,
P., Dipl.-Ing.; Bezold, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Meister, W., Dipl.-Ing.; Hilgers, H., Dipl.-Ing.;
Meyer-Plath, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Ehnold, A.,
Dipl.-Ing.; Schuster, T., Dipl.-Phys.; Goldbach, K.,
Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Aufenanger, M., Dipl.-Ing.;
Klitzsch, G., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, NL

⑦2 Erfinder:

Hara, Ltd., Makoto c/o Fuji Photo Film Co.,
Ashigara-kami-gun Kanagawa, JP

⑤4 Signalverarbeitungsmethode zur Bestimmung des Grundaufbaus von Nukleinsäuren.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 37 81 307 T 2

87 104 502.7

FUJI PHOTO FILM CO LTD

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Signalverarbeitungsverfahren zum Bestimmen der Basensequenz von Nukleinsäuren.

Beschreibung des Standes der Technik

Es ist wichtig, die von Organismen getragene genetische Information zu ermitteln, um die Funktions- oder Reproduktionsmechanismen der Organismen im Bereich der Molekularbiologie, welche sich in den letzten Jahren schnell entwickelt hat, aufzuklären. Insbesondere ist es wichtig, die Basensequenz von Nukleinsäuren, wie zum Beispiel DNA (oder ein DNA-Fragment; im folgenden wird darauf Bezug genommen), welche spezifische genetische Information tragen, zu bestimmen.

Das Maxam-Gilbert-Verfahren und das Sanger-Coulson-Verfahren sind als typische Verfahren zum Bestimmen der Basensequenz von Nukleinsäuren, wie zum Beispiel DNA und RNA, bekannt. Bei dem früheren Maxam-Gilbert-Verfahren wird eine ein radioaktives Isotop, wie zum Beispiel ^{32}P enthaltende Gruppe an einem Kettenmolekül einer DNA oder eines DNA-Fragments an einem Ende angebracht, um es mit dem radioaktiven Element zu markieren, und dann wird die Bindung zwischen den Struktureinheiten des Kettenmoleküls basenspezifisch durch

eine chemische Reaktion aufgespaltet. Eine Mischung aus den resultierenden basenspezifischen DNA-Spaltprodukten wird durch Gelelektrophorese aufgelöst (entwickelt), um ein aufgelöstes Muster (nicht sichtbar) zu erhalten, wobei jedes der zahlreichen Spaltprodukte auf dem Gelträgermedium aufgelöst wird. Das aufgelöste Muster wird auf einem radiographischen Film, wie zum Beispiel einem Röntgenstrahlenfilm, sichtbar gemacht, um davon einen Autoradiographen als ein sichtbares Bild zu erhalten. Die Basen in bestimmten Positionsbeziehungen zu dem Ende des mit dem radioaktiven Element versehenen Kettenmoleküls können sequentiell entsprechend dem sichtbar gemachten Autoradiographen und den angewandten basenspezifischen Abspaltungsmitteln bestimmt werden. Auf diese Weise kann die Sequenz für alle Basen der DNA-Probe bestimmt werden.

Bei dem späteren Sanger-Coulson-Verfahren werden synthetische DNA-Produkte, welche zu den Kettenmolekülen der DNA oder des DNA-Fragments komplementär und radioaktiv markiert sind, basenspezifisch durch Verwendung einer chemischen Reaktion synthetisiert, und die erhaltene Mischung aus zahlreichen synthetischen DNA-Produkten wird auf einem Trägermedium durch Gelelektrophorese aufgelöst, um ein aufgelöstes Muster zu erhalten. In einer Weise, die der oben beschriebenen ähnlich ist, kann die Basensequenz von DNA entsprechend dem sichtbar gemachten Autoradiographen bestimmt werden.

Zum Zwecke der Durchführung der Basensequenzbestimmung von Nukleinsäuren auf einfache Weise durch Radiographie dienen die in den US-Patentanmeldungen Nr. 664 405 und Nr. 837 037 beschriebenen autoradiographischen Methoden, welche ein Strahlungsbildaufzeichnungs- und -reproduktionsverfahren unter Verwendung einer stimulierbaren Phosphorfolie anstelle der oben erwähnten herkömmlichen, ein

strahlungsempfindliches Material, wie zum Beispiel einen Röntgenstrahlenfilm, verwendenden Radiographie benutzen. Die stimulierbare Phosphorfolie umfaßt einen stimulierbaren Phosphor und weist solche Eigenschaften auf, daß, wenn sie einer Strahlung ausgesetzt wird, der stimulierbare Phosphor einen Teil der Strahlungsenergie absorbiert und dann bei Anregung mit einer elektromagnetischen Welle (stimulierende Strahlen), wie zum Beispiel sichtbaren oder infraroten Lichtstrahlen, entsprechend der darin gespeicherten Strahlungsenergie Licht emittiert (stimulierte Emission). Entsprechend diesem Verfahren kann die Expositionsdauer wesentlich verkürzt werden, und es besteht keine Gefahr, daß Probleme wie beim Stand der Technik, wie zum Beispiel die chemische Zerstörung der Emulsion, auftreten. Ferner kann, da der Information über radioaktiv markierte Substanzen aufweisende Autoradiograph in der Phosphorfolie als Strahlungsenergie gespeichert ist und dann als stimulierte Emission in zeitlicher Folge ausgelesen wird, Information in Form von Zahlenangaben und/oder Symbolen zusätzlich zu dem Bild dargestellt werden.

Die Basensequenz der Nukleinsäuren wurde herkömmlich durch visuelle Beurteilung einzelner aufgelöster Positionen der basenspezifischen Spaltungsprodukte oder der basenspezifischen synthetischen Produkte der radioaktiv markierten Nukleinsäure (im folgenden einfach als basenspezifische Fragmente von Nukleinsäure bezeichnet) auf dem Autoradiographen und durch Vergleichen dieser zwischen ihren aufgelösten Reihen bestimmt. Die Analyse des Autoradiographen wird nämlich durch Beobachten des sichtbar gemachten Autoradiographen mit den Augen durchgeführt, und eine solche visuelle Analyse erfordert viel Zeit und Arbeit.

Da die visuelle Analyse des Autoradiographen ferner entsprechend der Erfahrung der die Untersuchung

durchführenden Person variiert oder schwankt, ändern sich die Resultate der Bestimmung der Basensequenz von Nukleinsäure abhängig von der die Untersuchung durchführenden Person, und die Genauigkeit der Information ist in einem bestimmten Umfang begrenzt.

Um die Genauigkeit der Information zu verbessern, sind in den US-Patentanmeldungen Nr. 568 877, Nr. 730 034, Nr. 917 606 und Nr. 917 609 Verfahren zum automatischen Bestimmen der Basensequenz von DNA durch Ermitteln des Autoradiographen als digitale Signale und geeignete Verarbeitung der Signale vorgeschlagen worden. Die dem Autoradiographen entsprechenden Digitalsignale können entweder durch Sichtbarmachen des Autoradiographen auf einem radiographischen Film und photoelektrisches Auslesen des sichtbaren Bildes auf dem Film mit Hilfe von reflektiertem oder hindurchtretendem Licht, wenn die konventionelle Radiographie angewendet wird, oder durch direktes Auslesen der stimulierbaren Phosphorfolie ohne die Sichtbarmachung des Autoradiographen, wenn das Strahlungsbildaufzeichnungs- und -reproduktionsverfahren verwendet wird, ermittelt werden.

Das aufgelöste Muster, das durch Auflösen (Entwickeln) radioaktiv markierter Substanzen auf einem Trägermedium durch Elektrophorese oder ähnliches erhalten wird, neigt jedoch dazu, verschiedene Verzerrungen und Störungen aufzuweisen. Wenn die Erzeugung und die Trennung der basenspezifischen Fragmente während der Präparation einer Probe ungenügend sind, oder wenn die basenspezifischen Fragmente während der Einführung der Probe in die Schlitze miteinander gemischt werden, erscheinen zufällig Bänder an Positionen (Geisterbänder oder Extrabänder), wo irgendein der aufgelösten Reihe inhärentes Band nicht existieren sollte. Wenn die Probe mit radioaktiven Verunreinigungen kontaminiert ist oder wenn eine stimulierbare Phosphorfolie

oder ein strahlungsempfindliches Material einer natürlichen Strahlung ausgesetzt ist, wird ein Störuntergrund auf dem Autoradiographen erzeugt. Die solche Geisterbänder enthaltenden Bänder werden miteinander verglichen und im Ergebnis wird ein Fehler bei der Bestimmung der Basensequenz bewirkt, der die Genauigkeit der Information über die Basensequenz verringert.

Es ist daher sehr wünschenswert, die Basensequenz von Nukleinsäuren mit hoher Genauigkeit durch Signalverarbeitung der dem Autoradiographen entsprechenden digitalen Signale, sogar wenn der Störuntergrund auf dem Radiographen vorhanden ist, zu bestimmen.

Zusammenfassung der Erfindung

Durch die vorliegende Erfindung wird erreicht, daß die Basensequenz von Nukleinsäuren automatisch einfach und mit hoher Genauigkeit durch geeignete Verarbeitung der dem Autoradiographen des aufgelösten Musters entsprechenden digitalen Signale bestimmt wird, sogar wenn auf dem Autoradiographen ein Störuntergrund vorliegt.

Die vorliegende Erfindung, wie sie im Anspruch 1 definiert ist, stellt ein Signalverarbeitungsverfahren zum Bestimmen der Basensequenz von Nukleinsäuren zur Verfügung, bei dem digitale Signale einer Signalverarbeitung unterworfen werden, wobei die digitalen Signale einem Autoradiographen einer Vielzahl aufgelöster Reihen entsprechen, welche durch Auflösen einer Mischung aus mit einem radioaktiven Element markierten basenspezifischen DNA-Fragmenten oder basenspezifischen RNA-Fragmenten in eindimensionaler Richtung auf einem Trägermedium gebildet sind, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:

- (1) Vorbereiten einer eindimensionalen Wellenform, die aus der Position entlang der Auflösungsrichtung und dem Signalpegel für jede aufgelöste Reihe besteht;
- (2) Berechnen eines Mittelwertes des Signalpegels in Bereichen mit oder über einem gegebenen Niveau innerhalb eines gegebenen Intervalls von einem Suchvergleichspunkt aus auf der eindimensionalen Wellenform;
- (3) Bestimmen eines Schwellenwertes, der auf dem mittleren Pegelwert basiert;
- (4) Absuchen des Intervalls nach einem Maximum, wo der Signalpegel nicht geringer als der Schwellenwert ist;
- (5a) Feststellen, daß bei der Maximumposition ein Band existiert, und Zulassen, daß die Maximumposition der nächste Suchvergleichspunkt ist, wenn in dem Schritt (4) ein Maximum gefunden worden ist, oder
- (5b) Zulassen, daß eine Position, welche um eine gegebene Entfernung von dem Suchvergleichspunkt liegt, der nächste Suchvergleichspunkt ist, wenn kein Maximum in dem Schritt (4) gefunden worden ist; und
- (6) Wiederholen der Schritte (2) bis (5) in Reihenfolge, um dadurch alle Bänder auf den aufgelösten Reihen zu erfassen.

Entsprechend der vorliegenden Erfindung kann die Basensequenz von Nukleinsäuren einfach mit hoher Genauigkeit bestimmt werden, indem die Digitalsignale, die dem Autoradiographen eines aufgelösten Musters entsprechen,

welches durch Auflösen eines Musters der basenspezifischen Fragmente einer Nukleinsäure auf ein Trägermedium gebildet ist, durch eine geeignete Signalverarbeitungsschaltung, welche zur Eliminierung von Störuntergrund und zur Erfassung nur der intrinsischen, wirklichen Bänder in der Lage ist, sogar wenn das aufgelöste Muster einen Störuntergrund verursacht, zu bestimmen.

Das Verfahren nach der Erfindung löst das folgende, mit den Extrabändern verbundene Problem. Die Bilddichte (Pegel des digitalen Signals) eines infolge der Mischung einer Probe oder der natürlichen Strahlung auftretenden Störuntergrunds und eines Extrabands ist im allgemeinen geringer als diejenige des eigentlichen Bandes. Bei dem Sanger-Coulson-Verfahren jedoch ist die Menge des radioaktiven Elements erhöht und die Intensität der Radioaktivität wird im Verhältnis höher, wenn das Molekulargewicht der basenspezifischen Fragmente der Probe erhöht wird. Auf dem Autoradiographen wird ein Dichtegradient (Änderung des Signalpegels) erzeugt, so daß die Bilddichte verringert ist, wenn die Migrationslänge größer wird. Es besteht die Gefahr, daß ein Fehler derart gemacht wird, daß ein Extraband als wirkliches Band erfaßt und ein wirkliches Band irrtümlich, wenn bestimmt wird, ob das eigentliche Band existiert oder nicht, oder ob ein Band ein eigentliches Band ist oder nicht, was einfach auf der Tatsache beruht, ob das Maximum des Signalpegels höher als der voreingestellte Schwellenwert ist oder nicht. Die genaue Information über die Basensequenz von Nukleinsäuren kann nicht erhalten werden.

Entsprechend dem Verfahren nach der vorliegenden Erfindung können nur wirkliche Bänder vollständig auf der Basis eines von Intervall zu Intervall wechselnden Schwellenwertes ermittelt werden, indem der Mittelwert von Signalniveaus für

jedes Intervall berechnet und der Schwellenwert eingestellt wird, welcher es ermöglicht, ein wirkliches Band für jedes Intervall basierend auf dem mittleren Wert vom Störuntergrund zu trennen. Die Basensequenz von Nukleinsäuren kann sehr bequem und mit hoher Genauigkeit durch Vergleichen der erfaßten Bänder zwischen den aufgelösten Reihen auf der Basis der Bandpositionen bestimmt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- Fig.1 zeigt ein Beispiel des Autoradiographen eines elektrophoretischen Musters, welches einen Dichtegradienten aufweist.
- Fig.2 zeigt eine eindimensionale Wellenform für den ersten Streifen entlang dem in Fig. 1 gezeigten Pfeil.
- Fig.3 ist eine vergrößerte Teilansicht von Fig. 2.
- Fig.4 ist eine andere vergrößerte Teilansicht von Fig. 2, welche ein Ausführungsbeispiel des Verfahrens nach der vorliegenden Erfindung zeigt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Beispiele von in der vorliegenden Erfindung verwendbaren Proben enthalten Mischungen aus basenspezifischen Fragmenten von Nukleinsäuren, wie zum Beispiel DNA und RNA, welche mit einem radioaktiven Element markiert sind. Mit der Bezeichnung "Fragmente" von Nukleinsäuren sind Teile eines Langkettenmoleküls gemeint. Zum Beispiel kann eine Mischung aus basenspezifischen DNA-Spaltungsprodukten, welche eine

Art einer Mischung aus basenspezifischen DNA-Fragmenten darstellt, durch basenspezifisches Spalten der radioaktiv markierten DNA entsprechend dem vorangehend erwähnten Maxam-Gilbert-Verfahren erhalten werden. Eine Mischung von synthetischen basenspezifischen DNA-Produkten kann durch Synthetisieren aus radioaktiv markierten Desoxynukleosid-Triphosphaten und DNA-Polymerase unter Verwendung von DNA als einer Schablone entsprechend dem vorangehend erwähnten Sanger-Coulson-Verfahren hergestellt werden.

Mischungen basenspezifischer RNA-Fragmente können auch als eine Mischung von Spaltprodukten oder eine Mischung von synthetischen Produkten in zu den DNA-Verfahren ähnlicher Weise erhalten werden. DNA ist aus vier Arten von Basen, nämlich Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin als ihre strukturellen Einheiten, zusammengesetzt, und RNA ist aus vier Arten von Basen, nämlich Adenin, Guanin, Uracil und Cytosin zusammengesetzt. Diese Substanzen können mit radioaktiven Elementen, wie zum Beispiel ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S , ^3H oder ^{125}I durch irgendein geeignetes Verfahren markiert werden.

Eine Probe, welche eine Mischung aus den mit einem radioaktiven Element markierten basenspezifischen Fragmenten einer Nukleinsäure darstellt, kann auf einem bekannten Trägermedium, wie zum Beispiel einem Gelträgermedium, durch irgendeine herkömmliche Auflösungsmethode (Entwicklungsmethode), wie zum Beispiel Elektrophorese, Dünnschichtchromatographie, Säulenchromatographie und Papierchromatographie, aufgelöst (entwickelt) werden.

Das Trägermedium, auf welchem die radioaktiven Substanzen aufgelöst werden, wird mit Hilfe der herkömmlichen Radiographie unter Verwendung eines strahlungsempfindlichen

Materials oder des Strahlungsbildaufzeichnungs- und -reproduktionsverfahrens unter Verwendung einer stimulierbaren Phosphorfolie autoradiographisch untersucht. Die digitalen Signale, die dem Autoradiographen entsprechen, werden dann mit Hilfe eines geeigneten Auslesesystems erhalten.

Wenn die herkömmliche Radiographie verwendet wird, werden das Trägermedium und ein strahlungsempfindliches Material, wie zum Beispiel ein Röntgenstrahlenfilm, zusammen in Schichten bei niedriger Temperatur oder bei Raumtemperatur über eine lange Zeitperiode (mehrere 10 Stunden) angeordnet, um den radiographischen Film zu exponieren. Der radiographische Film wird dann entwickelt, um den Autoradiographen der radioaktiv markierten Substanzen auf dem Film sichtbar zu machen, und der sichtbar gemachte Autoradiograph wird Hilfe eines Bildauslesesystems ausgelesen. Zum Beispiel wird der Film mit einem optischen Bündel bestrahlt, und das durch diesen hindurchgetretene oder von diesem reflektierte Bündel wird photoelektrisch erfaßt, wodurch der sichtbar gemachte Autoradiograph in elektrische Signale umgewandelt werden kann. Die elektrischen Signale werden ferner durch A/D-Umwandlung in digitale Signale umgewandelt, welche dem Autoradiographen entsprechen.

Wenn das Strahlungsbildaufzeichnungs- und -reproduktionsverfahren verwendet wird, werden das Trägermedium und die stimulierbare Phosphorfolie zusammen in Schichten bei Umgebungstemperatur über einen kurzen Zeitraum (mehrere Minuten oder mehrere 10 Minuten) angeordnet, um Strahlungsenergie, welche von den radioaktiv markierten Substanzen ausgestrahlt wird, in der Phosphorfolie zu speichern, wodurch der Autoradiograph in Form eines latenten Bildes (Energiespeicherbild) auf der Phosphorfolie

aufgezeichnet wird. Die stimulierbare Phosphorfolie weist zum Beispiel eine Basisstruktur auf, in der ein ein Plastikfilm umfassender Träger, eine Phosphorschicht, die einen stimulierbaren Phosphor, wie zum Beispiel einen divalenten, europiumaktivierten Bariumbromidphosphor (BaFBr:Eu^{2+}) umfaßt, und ein transparenter Schutzfilm in dieser Reihenfolge laminiert sind. Der stimulierbare Phosphor kann, wenn er mit einer Strahlung, wie zum Beispiel Röntgenstrahlung, bestrahlt wird, Strahlungsenergie absorbieren und speichern und die gespeicherte Strahlungsenergie danach als stimulierte Emission abgeben, wenn er mit sichtbaren oder infraroten Strahlen angeregt wird.

Dann wird der gespeicherte und auf der stimulierbaren Phosphorfolie aufgezeichnete Autoradiograph unter Verwendung eines Auslesesystems ausgelesen. Zum Beispiel wird die Phosphorfolie mit einem Laserstrahl abgetastet, um die in dem stimulierbaren Phosphor gespeicherte Strahlungsenergie als Lichtemission freizusetzen, und das emittierte Licht wird photoelektrisch erfaßt, so daß der Autoradiograph direkt in Form elektrischer Signale ohne seine Sichtbarmachung erhalten werden kann. Die elektrischen Signale werden ferner durch A/D-Umwandlung in digitale Signale umgewandelt, welche dem Autoradiographen entsprechen.

Die oben erwähnten Verfahren zum Messen des Autoradiographen und zum Ermitteln der diesem entsprechenden digitalen Signale sind genauer in den vorangehend erwähnten US-Patentanmeldungen Nr. 568 877 und Nr. 837 037 beschrieben.

Während die Verfahren zum Ermitteln der dem Autoradiographen entsprechenden digitalen Signale unter Verwendung

herkömmlicher Radiographie und des Strahlungsbildaufzeichnungs- und -reproduktionsverfahrens oben beschrieben sind, ist die vorliegende Erfindung nicht darauf beschränkt, und durch andere Verfahren erhaltene digitale Signale können bei dem Signalverarbeitungsverfahren nach der Erfindung angewendet werden, vorausgesetzt, daß sie dem Autoradiographen entsprechen.

Bei den oben erwähnten Verfahren ist es nicht immer notwendig, den Auslesevorgang des Autoradiographen auf der gesamten Oberfläche des radiographischen Films oder der stimulierbaren Phosphorfolie durchzuführen. Es braucht nur der Bildbereich der Auslesung unterzogen zu werden.

Bei der vorliegenden Erfindung kann vorhergehend Information über den Ort von jeder aufgelösten Reihe und die Breite des Bandes, um Auslesebedingungen voreinzustellen, eingegeben und dann eine Abtastung bei einer Abtastliniendichte derart, daß jedes Band bei dem Auslesevorgang von wenigstens zwei Abtastlinien bei dem Auslesevorgang durchquert wird, durchgeführt werden, um so die Auslesezeit zu verkürzen und effizient die notwendige Information zu erhalten. Die dem Autoradiographen entsprechenden digitalen Signale umfassen gemäß der Erfindung auch die auf diese Weise erhaltenen digitalen Signale.

Die erhaltenen digitalen Signale D_{xy} umfassen eine Koordinate (x, y) , welche durch ein Koordiantensystem repräsentiert ist, das fest mit dem radiographischen Film oder der stimulierbaren Phosphorfolie verbunden ist, und einen Signalpegel (z) bei dieser Koordinate. Der Signalpegel repräsentiert die Dichte des Bildes bei der Koordinate, d.h., die Menge der radioaktiv markierten Substanzen. Entsprechend enthält eine Serie von den digitalen Signalen (nämlich digitalen Bilddaten) Information über eine

zweidimensionale Ortsverteilung der markierten Substanzen.

Die digitalen Signale, die dem Autoradiographen der radioaktiv markierten Substanzen, die auf einem Trägermedium aufgelöst sind, entsprechen, werden einer Signalverarbeitung unterworfen, um die Basensequenz der Nukleinsäure entsprechend der Erfindung zu bestimmen, wie im folgenden genauer beschrieben wird.

Nun wird das Signalverarbeitungsverfahren nach der vorliegenden Erfindung beschrieben, indem auf ein Beispiel eines elektrophoretischen Musters Bezug genommen wird, welches aus einer Kombination der folgenden vier Gruppen von basenspezifischen DNA-Fragmenten, die mit einem radioaktiven Element markiert sind, gebildet wird:

- (1) Guanin (G) - spezifische synthetische DNA-Produkte,
- (2) Adenin (A) - spezifische synthetische DNA-Produkte,
- (3) Thymin (T) - spezifische synthetische DNA-Produkte,
- (4) Cytosin (C) - spezifische synthetische DNA-Produkte.

Jede Gruppe dieser basenspezifischen DNA-Syntheseprodukte ist aus nach dem Sanger-Coulson-Verfahren synthetisierten Produkten zusammengesetzt, welche verschiedene Längen haben und die gleiche Base an Enden aufweisen. Auf dem Radiographen wird ein Dichtegradient entlang der Auflösungsrichtung (in der Richtung eines Pfeils) bewirkt.

Fig. 1 zeigt einen Autoradiographen des elektrophoretischen Musters, das jeweils durch Elektrophoresebehandlung der oben erwähnten vier Gruppen der basenspezifischen DNA-Syntheseprodukten in vier Schlitzen erhalten wird.

Die dem Autoradiographen entsprechenden digitalen Signale werden zeitweilig in einer Speichereinrichtung der

Signalverarbeitungsschaltung gespeichert (d.h. in einer nicht flüchtigen Speichereinheit, wie zum Beispiel einem Pufferspeicher, einer Magnetplatte usw.).

Zuerst wird eine eindimensionale Wellenform vorbereitet, die aus einer Position entlang der Auflösungsrichtung und einem Signalpegel für jede aufgelöste Reihe (Streifen) zusammengesetzt ist.

Fig. 2 zeigt eine eindimensionale Wellenform für den ersten Streifen, die durch Abnehmen digitaler Signale in der Richtung des in Fig. 1 gezeigten Pfeils gebildet ist. Fig. 2 entspricht der Schnittansicht der Bilddichte für den ersten Streifen.

Fig. 3 ist eine vergrößerte Teilansicht von Fig. 2. In Fig. 3 ist der linke Teil eine Zone nahe der Elektrophoresestartposition, und der Peak A (an welchem das Signalniveau ein Maximum ist) ist niedriger als die Peaks auf beiden Seiten davon, so daß der Peak A zweifellos ein Extraband ist oder einen Störuntergrund repräsentiert. Der rechte Teil ist eine Zone (in der die Migrationslänge lang ist), welche von der Elektrophoresestartposition fernab liegt, und der Peak B wird im Vergleich mit anderen Peaks als ein eigentlicher Peak erkannt. Wenn jedoch die Spitze A mit der Spitze B verglichen wird, so ist der Signalpegel der Spitze A höher als derjenige der Spitze B. Es ist zu verstehen, daß eine Bestimmung, ob ein Peak ein intrinsischer Peak ist oder nicht, nicht einfach anhand des Signalpegels (Absolutwerts) von jeder Spitze durchgeführt werden sollte. Es ist wichtig, daß ein relativer Vergleich durchgeführt wird, indem Signalniveaus um den zu bestimmenden Peak herum in die Betrachtung einbezogen werden.

Fig. 4 ist eine vergrößerte Teilansicht der eindimensionalen Wellenform von Fig. 2 und zeigt ein Ausführungsbeispiel, welches das Wesentliche der vorliegenden Erfindung, die sich auf die Bestimmung eines Schwellenwerts und die Erfassung eines Bands auf der Basis des Schwellenwerts bezieht, verdeutlicht.

Die nachfolgende Vorgehensweise zum Ermitteln eines Bandes wird unter Bezugnahme auf Fig. 4 beschrieben.

Es wird zweitens der Mittelwert Z_i von Signalpegeln Z innerhalb eines gegebenen Intervalls L von dem Suchvergleichspunkt x_i der Bandsuche auf der eindimensionalen Wellenform berechnet.

Der Suchvergleichspunkt x_i in Fig. 4 ist die Position des Peaks C, welcher ein bereits bestimmtes intrinsisches Band ist. Gewöhnlich ist der erste Suchvergleichspunkt vorzugsweise das unterste Ende der Elektrophorese bei der größten Migrationslänge (das rechte Ende in Fig. 2), wo der Abstand zwischen Bändern groß ist und die Suche vorzugsweise vom unteren Ende der Elektrophorese aus zu dem oberen Ende in Reihenfolge durchgeführt wird.

Das Intervall L kann vorher auf einen Konstantwert auf der Basis der wahrscheinlichen Migrationslänge eingestellt werden (d.h., der praktischen Länge des Trägermediums), oder kann als geeignete Funktion der Migrationslänge (oder der Position entlang der Elektrophoreserichtung) eingestellt werden, um diesem so zu ermöglichen, abhängig von der Suchposition zu variieren. Im letzteren Fall wird die Anzahl der zu erfassenden Peaks innerhalb eines Intervalls ohne Rücksicht auf die Suchposition ungefähr konstant vorgesehen. Das Intervall L kann von dem Vergleichspunkt x_i in der Suchposition [in der Richtung eines Pfeils (\leftarrow)],

wie in Fig. 4 gezeigt, begonnen werden, oder das Intervall L wird als Länge L/2 auf jeder von beiden Seiten des Vergleichspunktes vorgesehen.

Der mittlere Pegelwert Z_i kann durch Berechnen des mittleren Wertes von Signalniveaus in den Bereichen erhalten werden, in welchen das Signalniveau nicht kleiner als ein gegebener Wert Z_a ist, d.h., in den Bereichen L_1 , L_2 und L_3 . Es wird nämlich der mittlere Wert von Signalpegeln, die nicht kleiner als Z_a sind, erhalten. Daher können verhältnismäßig kleine Extrabänder und Störungen (Untergrundstörungen), die auf den gesamten Elektrophoresemuster erscheinen, entfernt werden.

Drittens wird ein Schwellenwert T_i auf der Basis des mittleren Wertes Z_i ermittelt. Der Schwellenwert T_i wird durch Ersetzen von Z_i durch eine vorbestimmte Funktion erhalten, in welcher eine Variable der mittlere Wert ist [$T_i = f(Z_i)$]. Zum Beispiel ist die folgende Formel gegeben.

$$T_i = \alpha \times Z_i,$$

worin der Koeffizient α eine positive Zahl verschieden von Null ist. Auf diese Weise wird der Schwellenwert T_i auf einen geeigneten Wert eingestellt, welcher es ermöglicht, Extrabänder und wirkliche Bänder voneinander zu trennen. In dem Fall, daß der Koeffizient α auf einen konstanten Wert größer als 1 eingestellt ist, können Extrabänder, sogar wenn der Peak des Extrabandes relativ groß ist oder sogar wenn viele Extrabänder existieren, ausgeschlossen werden. Die Funktion $f(Z_i)$ oder der Koeffizient α kann eine geeignete Funktion der Migrationslänge sein, um es dem Funktionswert, zu ermöglichen, abhängig von der Suchposition zu variieren.

Viertens wird das Intervall L von dem Suchvergleichspunkt X_i aus nach einem Peak (Peaks) abgesucht, bei welchem der Signalpegel nicht kleiner als der Schwellenwert T_i ist. Ein Peak ist ein Punkt mit einem maximalen Signalpegel auf der eindimensionalen Wellenform. Nur die Bereiche L_1 bis L_3 , wo die Signalpegel nicht kleiner als der Wert Z_a ist, brauchen nach Peaks abgesucht werden, und es braucht keine Suche über das gesamte Intervall L zu erfolgen, was die Suchzeit abkürzt.

Fünftens wird ein Peak (Peaks), bei welchem der Signalpegel nicht kleiner als der Schwellenwert T_i ist, als wirkliches, intrinsisches Band (Bänder) bestimmt, und ein Peak (Peaks), bei welchem der Signalpegel unterhalb T_i liegt, wird als Extraband (-bänder) oder Störuntergrund angesehen und wird ignoriert. In Fig. 4, treten zwei Peaks D und E in den Bereichen L_1 bis L_3 auf. Nur der Peak E, bei welchem der Signalpegel den Wert T_i übersteigt, wird als ein wirkliches Band ermittelt, und der Peak D wird als ein Extraband ausgeschlossen.

Wenn die Bandbestimmung in dem Intervall L abgeschlossen ist, kann die Position des Peaks E (wirkliches Band) des Pegels oberhalb des Schwellenwertes T_i der nächste Suchvergleichspunkt X_{i+1} sein. Die oben beschriebene Vorgehensweise wird in dem nächsten Intervall L von dem Vergleichspunkt X_{i+1} an wiederholt. Wenn zwei oder mehrere Peaks mit Pegeln oberhalb T_i existieren, kann der zu dem Vergleichspunkt am nächsten liegende Peak als der nächste Vergleichspunkt ausgewählt werden, um wirkliche Bänder mit viel höherer Genauigkeit zu bestimmen, indem eine kleine Änderung in umgebenden Signalpegeln in Betracht gezogen wird, während das Intervall geringfügig verschoben wird. Der fernste Peak von dem Vergleichspunkt in der Suchrichtung kann ausgewählt werden, um die Anzahl von Bandsuchschritten

zu reduzieren und die Verarbeitungszeit durch Verringern der Überlappung von Intervallen zu verringern.

Wenn kein Peak (wirkliches Band), bei welchem der Signalpegel nicht kleiner als der Schwellenwert T_i ist, existiert, kann eine Position bei einer gegebenen Distanz dL von dem Suchvergleichspunkt X_i als der nächste Suchvergleichspunkt X_{i+1} gewählt werden. Die oben beschriebenen Abläufe werden dann wiederholt. Diese Distanz dL kann vorher auf einen konstanten Wert, wie zum Beispiel eine einem Pixel entsprechende Länge, festgelegt werden, oder kann als eine Funktion der Migrationslänge eingestellt und auf der Basis des Vergleichspunkts bestimmt werden.

Die oben beschriebenen Verfahren werden wiederholt bis zu dem Elektrophoresestartpunkt (dem linken Ende von Fig. 2) durchgeführt, um alle wirklichen Bänder auf dem ersten Streifen zu erfassen. Die anderen drei Streifen werden den oben beschriebenen Verfahren unterworfen, um dadurch alle wirklichen Bänder auf dem Elektrophoresemuster zu erfassen.

Wenn das Elektrophoresemuster ein "smiling-Phänomen", verschiedene Verzerrungen, wie zum Beispiel eine Versatzverzerrung, und Kombination von einigen Bändern oder Störuntergrund zeigt, kann eine Signalverarbeitung zur Korrektur vor oder nach dem Bestimmen der Bandpositionen durchgeführt werden.

Das "smiling-Phänomen" ist ein Phänomen, bei welchem die Verschiebungsdistanzen der radioaktiv markierten Substanzen auf beiden Seiten des Trägermediums kürzer als diejenigen in der Nähe seiner Mitte sind. Das "smiling-Phänomen" wird durch den Wärmeausbreitungseffekt (sogenannter Randeffect), usw. während der Elektrophorese bewirkt. Die Versatzverzerrung ist ein Phänomen, bei welchem die

Positionen der Streifen gänzlich voneinander abweichen, und wird durch einen Unterschied zwischen den Schlitten in der Elektrophoresestartposition oder Startzeit von Proben bewirkt, was auf die Unebenheit der Formen von Schlitten usw. zurückzuführen ist. Die Kombination von Bändern ist ein Phänomen, bei welchem zwei oder drei Bänder kombiniert sind, um ein breites Band zu bilden, und die Kombination wird durch ungenügende Elektrophorese bewirkt. Gewöhnlich neigen kombinierte Bänder dazu, daß sie im oberen Bereich des Musters nahe der Elektrophoresestartposition auftreten.

Die Signalverarbeitungsverfahren zur Korrektur des "smiling-Phänomens", der Versatzverzerrung und der Kombination von Bändern sind in unseren mit dieser Anmeldung anhängigen japanischen Patentanmeldungen Nr. 60(1985)-74899, Nr. 60(1985)-74900, Nr. 60(1985)-85275, Nr. 60(1985)-85276, Nr. 60(1985)-111185 und Nr. 60(1985)-111186 (deren gesamter Inhalt den US-Patentanmeldungen Nr. 849,187, Nr. 854,381 und Nr. 866,355 entspricht) beschrieben.

Alle die Bänder werden unmittelbar der Reihe nach geordnet, indem die bestimmten Bandpositionen miteinander verglichen werden. Die Reihenfolge kann leicht durch Nutzen der Tatsache bestimmt werden, daß nicht zwei oder mehrere Bänder an den entsprechenden Positionen auf unterschiedlichen Streifen existieren, da die Kombination von den obengenannten vier Gruppen basenspezifischer DNA-Fragmente exklusiv ist. Da die Schlitze (1) bis (4) Information über die Endbasen von (G), (A), (T) bzw. (C) aufweisen, wird die Basensequenz von DNA durch Substituieren der Bänder mit den Schlitten entsprechenden Basen, welche zu den individuellen Bändern gehören, erhalten. Zum Beispiel kann die folgende Basensequenz von DNA erhalten werden.

A - G - C - T - A - A - G - ...

So kann die Basensequenz von einem Kettenmolekül von DNA bestimmt werden. Der Repräsentationsmodus der Information über die Basensequenz von DNA ist auf keinen Fall durch die oben erwähnte Art und Weise begrenzt und andere Darstellungsmöglichkeiten können verwendet werden. Zum Beispiel kann die Intensität (Z') von jedem Band als die relative Menge der radioaktiv markierten Substanzen, wenn gewünscht, dargestellt werden. Ferner kann auch die Basensequenz von allen zwei Kettenmolekülen von DNA dargestellt werden.

Information über die Basensequenz von DNA kann auch als ein Bild auf der Basis der oben beschriebenen verarbeiteten digitalen Signale angezeigt werden. Zur gleichen Zeit kann der ursprüngliche Autoradiograph als sichtbares Bild dargestellt werden. In diesem Fall kann eine die Untersuchung durchführende Person schließlich selbst die DNA-Sequenz auf der Basis des Anzegebildes bestimmen.

In dem obenerwähnten Beispiel wurde der Fall beschrieben, daß die alleinige Kombination der Mischung (G, A, T, C) von basenspezifischen DNA-Fragmenten als Probe verwendet wird, aber das Signalverarbeitungsverfahren nach der vorliegenden Erfindung ist auf keinen Fall auf diese Kombination beschränkt und andere Kombinationen können verwendet werden. Zum Beispiel kann eine Kombination von (G, G+A, T+C, C) verwendet werden. Ferner kann das Verfahren nach der Erfindung auch auf Mischungen (zum Beispiel eine Kombination von G, A, U, C) basenspezifischer RNA-Fragmente angewendet werden. Die Erfassung von Bändern ist nicht auf aufgelöste Reihen von einer Kombination basenspezifischer Fragmente einer Nukleinsäure beschränkt, sondern kann für die Gesamtheit von aufgelösten Reihen, die gleichzeitig auf einem Trägermedium aufgelöst sind, durchgeführt werden.

Es ist möglich, die genetisch-philologische Informationsverarbeitung zum Beispiel so durchzuführen, daß ein Vergleich zwischen der erhaltenen Basensequenz von DNA und der Basensequenz einer anderen DNA, welche bereits aufgezeichnet und in einer geeigneten Einrichtung gespeichert worden ist, durchzuführen.

Die Information über die Basensequenz von DNA, welche durch die oben beschriebene Signalverarbeitung ermittelt worden ist, wird von der Signalverarbeitungsschaltung ausgegeben und nachfolgend direkt oder wahlweise über Speicher in einer Speichereinrichtung, wie zum Beispiel eine Magnetplatte oder ein Magnetband, zu einer Aufzeichnungseinrichtung übertragen.

Auf verschiedenen Systemen basierende verschiedene Aufzeichnungsgeräte können für die oben beschriebenen Zwecke verwendet werden, zum Beispiel ein Gerät zum optischen Sichtbarmachen durch Abtasten eines photoempfindlichen Materials mit einem Laserstrahl usw., eine Displayeinrichtung zum Sichtbarmachen elektrisch auf einer Kathodenstrahlröhre, usw., eine Einrichtung zum Drucken eines auf einer Kathodenstrahlröhre dargestellten Strahlungsbildes mit Hilfe eines Videoprinters, und eine Einrichtung zum Sichtbarmachen auf einem wärmeempfindlichen Aufzeichnungsmaterial unter Verwendung von Wärmestrahlen.

EP 87 104 502.7-2213

FUJI PHOTO FILM CO., LTD.

Patentansprüche

1. Ein Signalverarbeitungsverfahren zum Bestimmen der Basissequenz von Nukleinsäuren, wobei digitale Signale einer Signalverarbeitung unterzogen werden und diese digitalen Signale einem Autoradiographen von mehreren aufgelösten Reihen, welche durch Auflösen einer Mischung aus mit einem radioaktiven Element markierten basisspezifischen DNA-Fragmenten oder basisspezifischen RNA-Fragmenten in einer Auflösungsrichtung auf einem Trägermedium gebildet werden, entsprechen, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt:

- (1) Auftragen eines eine Wellenform repräsentierenden Signalniveaus gegen Positionen entlang der Auflösungsrichtung für jede aufgelöste Reihe;
- (2) Berechnen eines mittleren Wertes der Signalniveaus in Bereichen mit oder über einem gegebenen Niveau innerhalb eines gegebenen Intervalls von einem Suchvergleichspunkt aus auf einer Wellenform;
- (3) Bestimmen eines Schwellenwertes, der auf dem mittleren Niveauwert basiert;
- (4) Absuchen des Intervalls nach einem Maximum, wo das Signalniveau nicht geringer als der Schwellenwert ist;

(5a) Feststellen, daß bei der Maximumposition ein Band existiert, und zulassen, daß die Maximumposition der nächste Suchvergleichspunkt ist, wenn in dem Schritt (4) ein Maximum gefunden worden ist, oder

(5b) Zulassen, daß eine Position, welche um eine gegebene Entfernung vor dem Suchvergleichspunkt liegt, der nächste Suchvergleichspunkt ist, wenn kein Maximum in dem Schritt (4) gefunden worden ist; und

(6) Wiederholen der Schritte (2) bis (5) in Reihenfolge, um dadurch alle Bänder auf den aufgelösten Reihen zu erfassen.

2. Das Signalverarbeitungsverfahren nach Anspruch 1, wobei der erste Suchvergleichspunkt in dem Schritt (2) eine Position ist, wo die Verschiebungsentfernung am größten ist, und der Schritt (6) in entgegengesetzter Richtung zu der Verschiebung ausgeführt wird.

3. Das Signalverarbeitungsverfahren nach Anspruch 1, wobei, in dem Schritt (5a) der Maximumposition, die dem Suchvergleichspunkt am nächsten liegt, ermöglicht wird, der nächste Suchvergleichspunkt zu sein.

4. Das Signalverarbeitungsverfahren nach Anspruch 1, wobei das gegebene Intervall und das gegebene Niveau in dem Schritt (2), der Schwellenwert in dem Schritt (3) und der gegebene Abstand in dem Schritt (5b) jeweils abhängig von der Position auf der Wellenform festgesetzt werden.

5. Das Signalverarbeitungsverfahren nach Anspruch 1, wobei die Mischung aus den basisspezifischen DNA-Fragmenten aus den vier Gruppen von

- (1) guanin-spezifischen DNA-Fragmenten;
- (2) adenin-spezifischen DNA-Fragmenten
- (3) thymin-spezifischen DNA-Fragmenten und
- (4) cytosin-spezifischen DNA-Fragmenten besteht,

und die aufgelösten Reihen aus vier Reihen bestehen, welche durch Auflösen von jeder der vier Gruppen der basisspezifischen DNA-Fragmente auf dem Trägermedium gebildet werden.

6. Das Signalverarbeitungsverfahren nach Anspruch 1, wobei die dem Autoradiograph entsprechenden digitalen Signale durch Anordnen des Trägermediums und einer einen stimulierbaren Phosphor umfassenden Phosphorfolienplatte zusammen in Schichten, um den Autoradiographen der aufgelösten Reihen auf der Phosphorfolienplatte als ein Energiespeicherbild zu erzeugen, durch Bestrahlen der Phosphorfolienplatte mit stimulierenden Strahlen und durch photoelektrisches Erfassen des Autoradiographen als stimulierte Emmission ermittelt werden.

7. Das Signalverarbeitungsverfahren nach Anspruch 1, wobei die dem Autoradiographen entsprechenden digitalen Signale durch Anordnen des Trägermediums und eines strahlungsempfindlichen Materials zusammen in Schichten, um den Autoradiographen der aufgelösten Reihen auf dem strahlungsempfindlichen Material als sichtbares Bild aufzuzeichnen, und durch photoelektrisches Auslesen des auf dem strahlungsempfindlichen Materials sichtbar gemachten Autoradiographen ermittelt werden.

1/2

FIG. 1

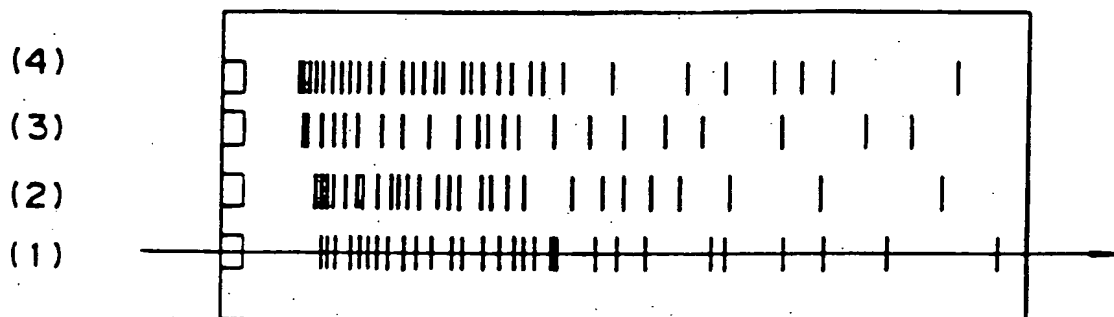
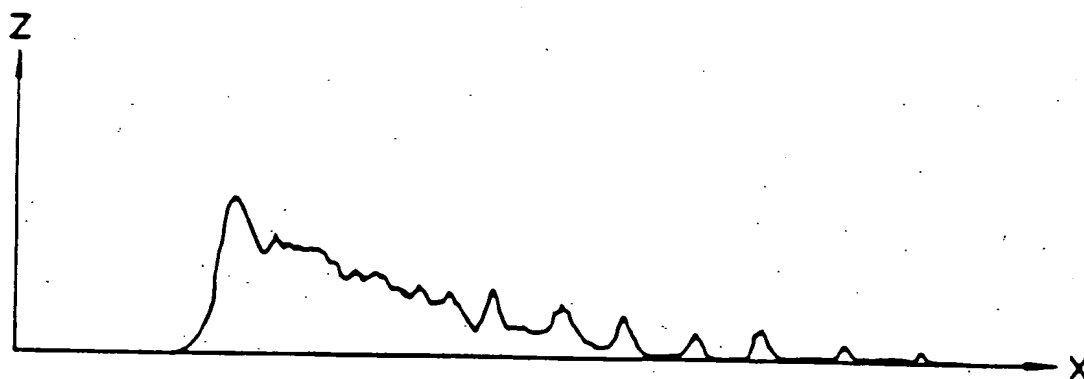


FIG. 2



2/2
FIG. 3

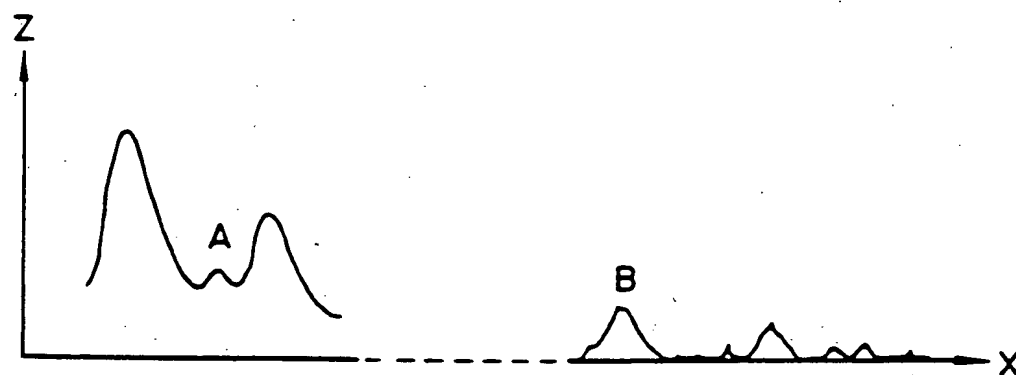
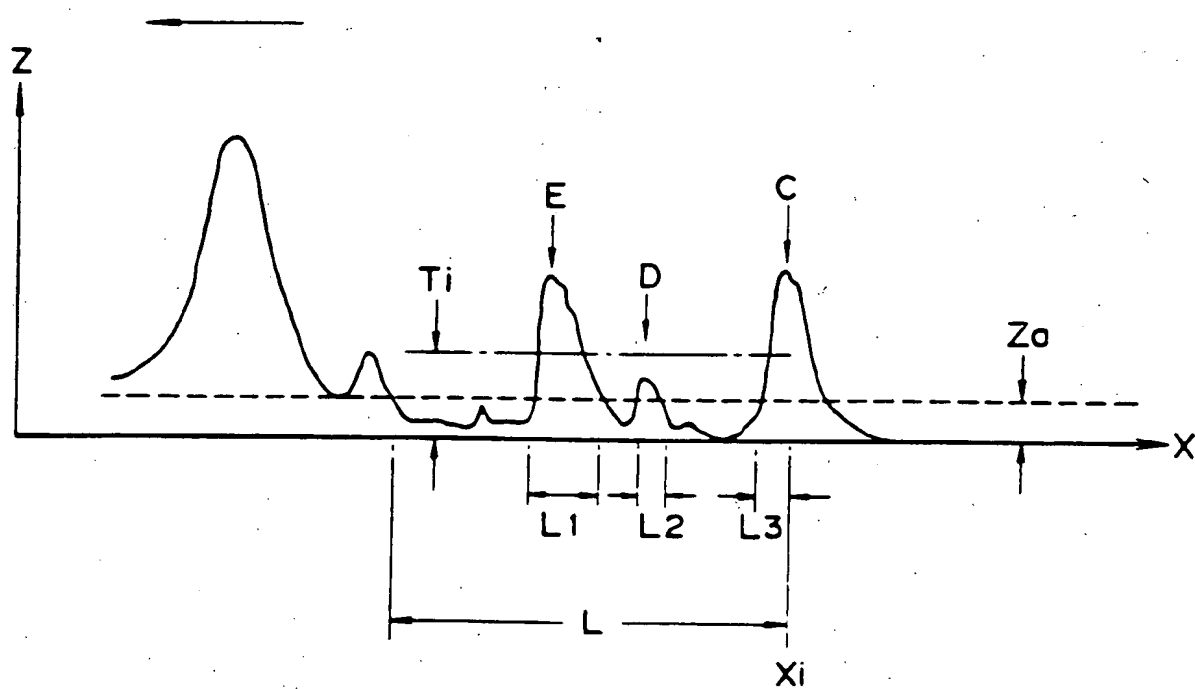


FIG. 4



This Page Blank